



TITLE:

上皮細胞の極性を用いたin vitroにおける三次元組織構造形成 (非線形現象の数理解析と実験解析)

AUTHOR(S):

三浦, 岳

---

CITATION:

三浦, 岳. 上皮細胞の極性を用いたin vitroにおける三次元組織構造形成 (非線形現象の数理解析と実験解析). 数理解析研究所講究録 2011, 1748: 125-133

ISSUE DATE:

2011-07

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/171078>

RIGHT:

# 上皮細胞の極性を用いた *in vitro* における三次元組織構造形成

三浦 岳\* †

## 概要

生体内では細胞は一定のルールを持って配列して組織構造を作る。このなかでも上皮組織は、腔に面する Apical 面、基底膜に接する Basal 面をもつシート構造を取っており、これが複雑に織り込まれた形をしていることによって栄養の吸収、溶液の分泌等の機能を発揮する。

実験的に扱う細胞株の中には、個々の細胞レベルでも上皮極性を強く維持する性質のものがある。このような細胞は、細胞外基質に接する面と腔に接する面を自発的に作り出す。この性質を用いると、細胞の凝集塊を作るだけで、その中で自発的に組織構造を作り出すはずである。本研究では、上皮極性を強く持つ MDCK 細胞株を用いて三次元的な立体構造を作りだす試みを紹介する。

## 1 Introduction

我々の体は細胞から出来ている。細胞は単にでたらめに寄り集まっている訳ではなく、器官ごとにあるルールを持って配列している。この配列した構造の事を組織と呼ぶ [1]。人の体の組織は、上皮組織、結合組織、筋組織、神経組織の 4 種類に分類されるが、本稿では上皮組織に焦点を絞って解説する。

上皮組織は、体の内と外の界面にあるシート状の組織である。体の外に接する面を Apical 面、体の中の組織に接する面を Basolateral 面と呼ぶ (Fig. 1a)。細胞同士は Tight Junction と呼ばれる構造で結合しており、表側と裏側の細胞膜は性質が異なる。細胞シートが一層か重層しているか、個々の細胞の厚みがどうかによって形態上の分類が行われる。また、上皮構造は単純に体の表面を覆っているだけではなく、湾曲した絨毛構造を作って栄養分を吸収するための表面積を広くしたり、枝分かれ構造を作ってガス/栄養分の交換を効率的に行ったりする (Fig. 1b, [1])。

\*Department of anatomy and developmental biology, Kyoto university graduate school of Medicine. Yoshida Konoe-chou, Sakyo-Ku, 606-8501, Japan. e-mail: miura-takashi@umin.ac.jp.

†JST PRESTO

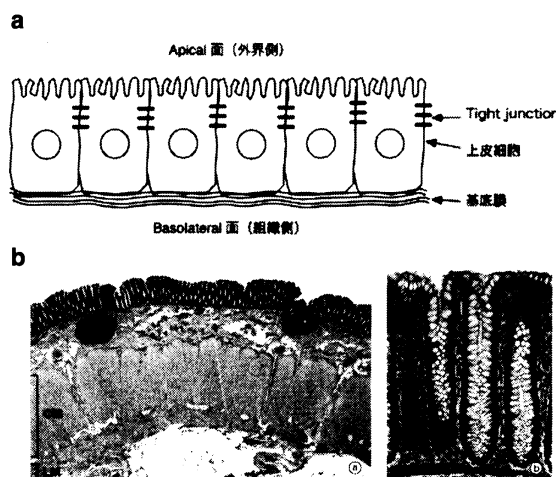


図 1: (a) 上皮組織の概念。上皮は体の中と外の界面にあるシート状の組織である。(b) 上皮組織の例。小腸の上皮はシートが折れ込んだ絨毛構造を作って表面積を広くしている [1]。

上皮細胞には2つの極性がある。一つは細胞シートの裏表方向の極性で、この形成に関わる主要な遺伝子は細胞の走化性に関わる遺伝子群と同一である事が知られている。[2]。この細胞内における自発的な極性形成については反応拡散系を用いたモデルが提唱されている [3]。もう一つは細胞シートの面に平行な方向の極性で、平面極性と呼ばれる [4]。この系に関しては、昆虫の体表の毛の方向の mutation を説明するモデルが提唱されている [5]。

上皮の組織構造がどのように形成されるのかは器官によって異なる。たとえば肺の枝分かれ構造は、上皮の周辺の組織が FGF10 と呼ばれる走化性の因子を出すことによって上皮の枝を引きつけて構造を形成する [6]。また、血管内皮細胞の培養系で出現する網目状の構造に関しては、細胞が VEGF とよばれる走化性因子を出して、VEGF の拡散係数に依存する大きさのクラスターを作ることによって周期的な構造を作りだすといわれている [7]。

上皮系の細胞株<sup>1</sup>の中には、上皮極性を非常に強く維持するものがある。その代表的なものは MDCK (Marine-Darby Canine Kidney) 細胞である (Fig. 2)。この細胞は入手が容易な上、増殖が速く、実験的に非常に扱いやすい。この細胞に関しては、単細胞レベルまでばらしてから Matrigel と呼ばれるゲルの中で培養すると自発的に Apical-Basal の方向性を持った嚢胞構造を作ることがわかっている [8]。また、この細胞が生えたディッシュ上にコラーゲンゲルをかけると、上皮の両方の面が Basal になるのを嫌って勝手にメッシュワーク上の構造を作る事が知られている [9]。このような各細胞が並ぶルールがわかっていると、どのような構造が生じやすいか、予測して作る事が可能である。本稿では、このような、上皮細胞個々

<sup>1</sup>細胞株とは、実験に使いやすいように癌化させて無限に増えるようにした細胞の事である。

の極性をうまく使って組織構造を作らせる試みを紹介する。

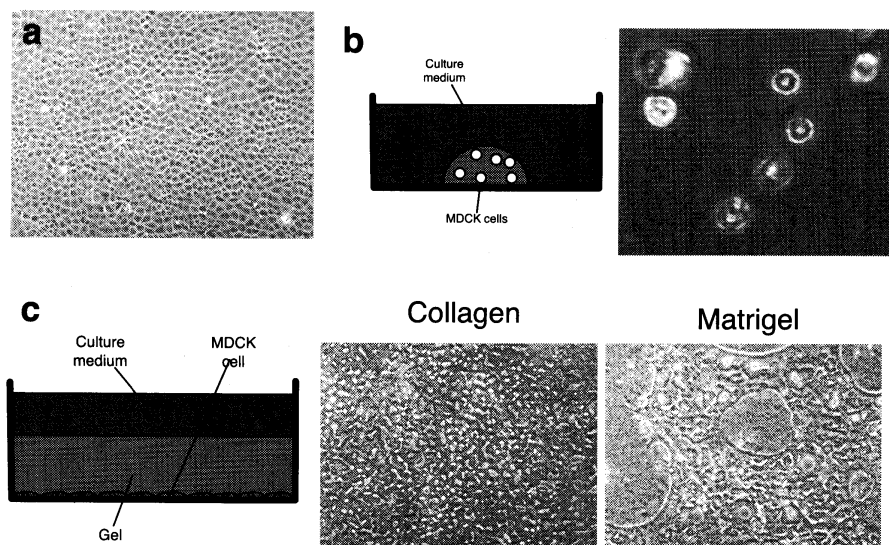


図 2: (a) MDCK 細胞. コンフルエントまで培養すると, 細胞の境界がきれいな多面体パターンをつくる. (b) この細胞をトリプシンでバラバラにしてから Matrigel の中で培養してやると, 培養 72 時間で嚢胞状の構造を作る. (c) (a) の状態の MDCK 細胞上にコラーゲンや Matrigel を重層してやると, メッシュワーク状の構造を形成する.

## 2 Materials & Methods

### 2.1 細胞培養

細胞株は理研のバイオリソースセンターから入手した. 培地には MEM と 10% FBS を用い, 2 日に一度培地交換を行った.

組織構造の形成の実験は, 細胞がほぼコンフルエントになった状態でまず Trypsin-EDTA で細胞をディッシュから剥がした, 次に, 35mm dish 一枚につき 1.5ml tube 一本分に分けて遠心し, 培地を除いた. 残った細胞ペレットに Matrigel (BD Biosciences) 40 $\mu$ l を加えて懸濁し, 再度遠心して余分な溶液を除いた. その後 37°C で 10 分間放置し, Matrigel 溶液が固まったところで培地を加えてチューブから分離して, ピペットでニトロセルロース膜上に移動させた. 培養は器官培養と同様の条件で, 培地と空気の界面部分で 24 時間培養を行った.

## 2.2 アクチン染色

培養後の細胞ペレットは、まず4%PFAで一晩固定した。さらに、アクチンを染色するために100倍希釈のPhalloidin-Rhodamine、核を染色するために1000倍希釈のHoechst33342 (化学同人)を加え、37°Cで2時間染色後、共焦点顕微鏡で構造を観察した。

## 2.3 パラフィン切片

培養後の細胞ペレットの一部は、ブアン溶液で固定した。さらにエタノールの希釈系列で脱水し、パラフィン包埋を行った。パラフィンプロックはマイクロトームで薄切し、HE染色を行って組織構造を観察した。

# 3 Results

## 3.1 上皮の配列のルールの記述

上皮細胞にはApical-Basalの極性がある。この極性は細胞内で自発的に形成される。実際にはディッシュからはがした直後など、極性がリセットされた状態は存在するが、今回は単純にすべての細胞が決まった強さのApical-Basalの方向性を持っていると考える。

上皮細胞同士は隣接する上皮細胞の性質によって極性の方向を変化させる。この細胞同士の配列のルールを考えると、細胞の極性方向と細胞同士の位置関係が両方効いてくることがわかる。例えば、細胞2つが横に並んでいる場合、側面同士が接している状態は生体内でもよくあるが、細胞個々の方向が同じでも縦に並んでいるような状態はまず見られない (Fig. 3a)。

このような相互作用をエネルギー形式で記述することを考える。単純化するために、個々の細胞の極性をApical面の方向を向くベクトルで表す。隣接している細胞2個が並んでいる場合に、それぞれがどのような方向であれば安定 (O) / 不安定 (X) かをプロットしてみると Fig. 3b のようになる。これらのピーク同士を単純につないで考えると、それぞれの細胞の方向を  $\phi_1, \phi_2$  として  $-\cos(\phi_2 - \phi_1)$  と書くことができる。しかし、この記述だとピーク同士の間の部分も安定になってしまうので、それぞれのピークが孤立しているような関数を探す必要がある。

次に、このような相互作用を行う素子が密に詰まっている場合、どのような状態に落ち着くかを考えてみる。一次元であれば横方向に並んで方向の揃ったシート構造が落ち着きやすい事がすぐわかる。二次元であればシートが表裏で順番に積み重なった構造が普通に考えると安定だが、上皮の配向がapical側の方が広がりやすいようになっていたらメッシュワーク状の構造、Basalの方が広がりやすいければcyst状の構造になる事が期待される (Fig. 3c)。

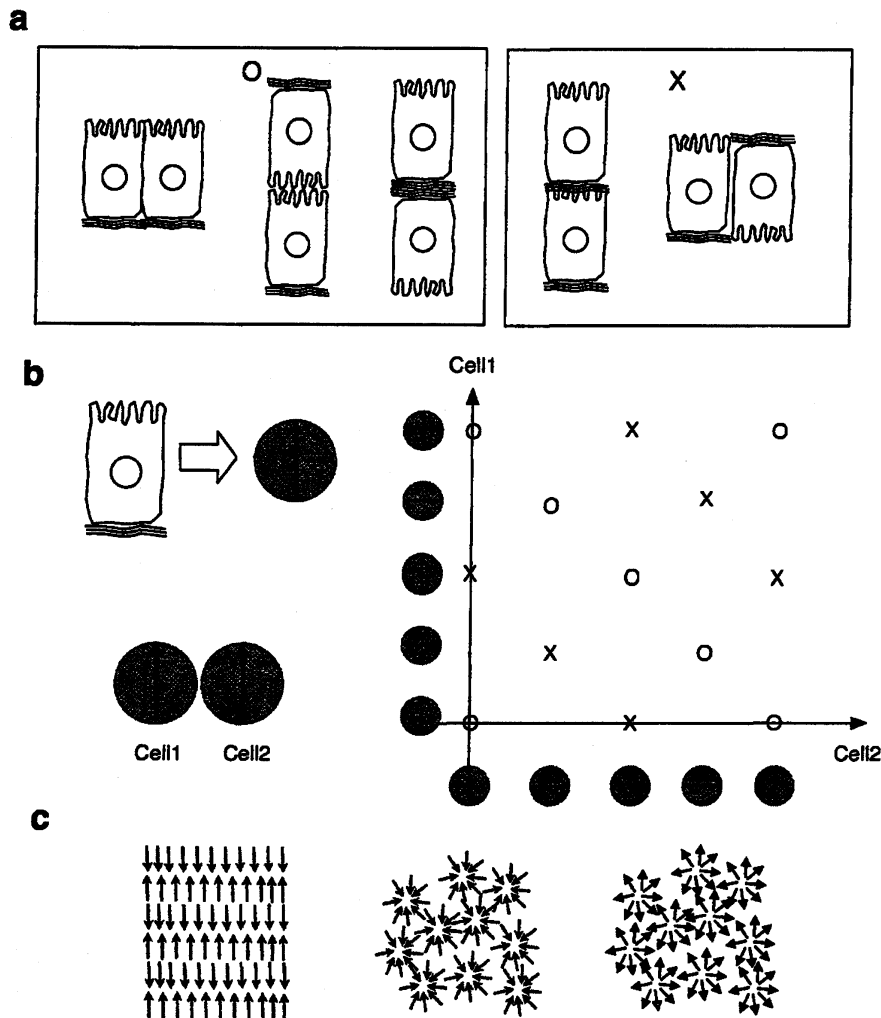


図 3: (a) 上皮細胞の配向のルール. Apical 面同士, Basolateral 面同士は接触可能 (O) だが、逆の接触は起こりえないはずである (X). (b) ルールの系統的な記述. 個々の細胞の極性を Apical 面の方向を向くベクトルで表し, 二つの細胞 (Cell1, Cell2) が横に並んでいる場合の配向の起こりやすい組み合わせをプロットしたもの. (c) このような細胞を固めて培養した場合に可能と思われる配列 (二次元).

### 3.2 ペレット培養による組織構造形成

細胞間に以上に記述したような相互作用があるとするれば、人工的に細胞を非常に高密度で固めてやると、なにかの組織構造が出現するはずである。この構造を形成させるため、細胞をトリプシン処理でバラバラにしてから、遠心処理によって細胞の固まりを作り、その固まりごと培養する実験を行った。細胞塊はある程度以上大きくなると、培地中で飼うだけでは中心が酸素欠乏状態になって壊死してしまう [10] ため、培地と空気の界面で培養するやり方を用いた (Fig. 4a)。

培養後の細胞のペレットに組織構造が形成されているか確認するために、まずパラフィン切片を作って HE 染色を行った。その結果、上皮細胞塊が単なる細胞の集まりではなく、予想通り多数の空胞を形成することがわかった (Fig. 4b)。ただし、空胞の大きさは予想されたように均一ではなく、非常に大きな空胞構造も場合によっては形成された。そのような空胞構造の内腔には細胞死の像が観察された (Fig. 4b, arrow)。

さらに、観察された構造が細胞極性の形成によって作られたのかどうかを検証するために、Apical 側の膜を染色する方法を使って空胞と細胞極性との関係を観察した (Fig. 4c, d)。その結果、空胞構造を形成する細胞膜は基本的には Apical 側であることが示された。

## 4 Discussion

極性を持つ上皮の相互作用は、定性的には高分子の diblock 分子の挙動と同一である。この挙動に関しては太田らにより定式化がなされ [11], FitzHugh-Nagumo 型の反応項を持つ反応拡散方程式に帰着できる事がわかっている [12]。すると、Fig. 3c のような区別は反応拡散系における stripe-spot selection [13] を用いて考えることができ、解析的な取り扱いが可能である。また、三次元では Fig. 3c に示したような単純な分類ではなくもっと多様なパターンが出現する事が知られており [12], 今回のような断面の観察だけでなくきちんとした立体構築を行う必要があると思われる。

また、このような上皮細胞の相互作用は、脂質二重膜を形成する極性因子の挙動とも定性的に同じはずである。このアナロジーで考えると、直感的に head size (親水基の相対的な大きさ) を変化させると Fig. 3c に示した形態変化を起こすことができるはずである。上皮細胞の例に落とすと、個々の細胞の Apical-basal の比を変化させることができれば cyst 状の構造から Meshwork 状の構造に変化させることができるはずである。実際の発生段階でも、上皮細胞の Apical 側が収縮することによって原腸陥入などの形態変化が起こる例が知られている [14]。

上皮細胞同士の相互作用をどのように定式化すべきなのか、まだ生物学的な理由を用いてきちんと記述できていない。今回は単純に細胞同士の性質として記述したが、実際には細胞が Basal 側に放出するコラーゲンを感知している [2]。前

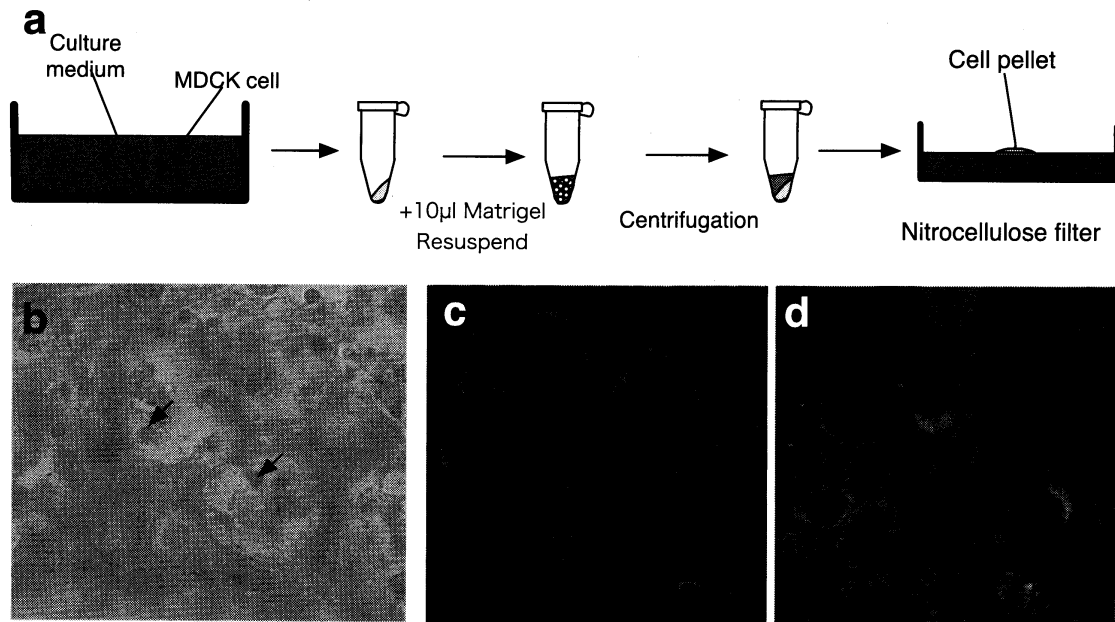


図 4: (a) MDCK 細胞を用いたペレット培養のプロトコル. (b) 24 時間培養後のペレットのパラフィン切片の HE 染色像. 多数の空胞が見られ, 空胞中に細胞死の像が見られる (矢印). (c) ペレットのアクチンの分布 (赤). 24 時間培養後のペレットをファロイジン-ローダミン染色し, 共焦点顕微鏡で観察した. 空胞構造を縁取るようにアクチン線維の集積が見られた. (d) Apical 膜に局在する蛋白 (Syntaxin3) の免疫染色 (緑). 空胞構造が Apical 膜で構成されていることがわかる.



述の通り、定性的な挙動は化学でよくわかっている系と同一で、数理的な道具も揃っている。したがって生物学的な情報の山と、数学的に整備された体系の間の一点だけがまだ開通していない状態である。

再生医学の一分野に組織工学というものがある。幹細胞から分化誘導して作り出した様々な種類の細胞を、きちんと生体内のルール通りに配列させる技術を開発しよう、という分野である。しかし、現状では培養皿の表面に細胞をうまく配列してやる方法、培養した細胞をシート状に取り外して積層してやる方法、カプセル化し多細胞を三次元プリンタで配列してやる方法など、工学的なセンスでデザイン通りくみ上げる、という方法論が多い。実際には**生体内では組織構造は細胞が勝手に作る**。細胞の特性をきちんと理解し、細胞個々の力を借りて組織構造を作るというアプローチも将来的には重要になってくると思われ、このMDCK細胞を用いた系はそのプロトタイプとして働く事が期待される。

## 参考文献

- [1] Barbara Young & James Lowe & Alan Stevens & John Heath & Philip Deakin. *Wheater's Functional Histology*. ELSEVIER, 2006.
- [2] Mirjam M.P. Zegers, Lucy E. OBrien, Wei Yu, Anirban Datta, and Keith E. Mostov. Epithelial polarity and tubulogenesis in vitro. *TRENDS in Cell Biology*, 13(4):169–176, 2003.
- [3] H. Meinhardt. Orientation of chemotactic cells and growth cones: models and mechanisms. *J Cell Sci*, 112 ( Pt 17):2867–2874, Sep 1999.
- [4] Matias Simons and Marek Mlodzik. Planar cell polarity signaling: from fly development to human disease. *Annu Rev Genet*, 42:517–540, 2008.
- [5] Keith Amonlirdviman, Narmada A Khare, David R P Tree, Wei-Shen Chen, Jeffrey D Axelrod, and Claire J Tomlin. Mathematical modeling of planar cell polarity to understand domineering nonautonomy. *Science*, 307(5708):423–426, Jan 2005.
- [6] S. Bellusci, J. Grindley, H. Emoto, N. Itoh, and B. L. Hogan. Fibroblast growth factor 10 (fgf10) and branching morphogenesis in the embryonic mouse lung. *Development*, 124(23):4867–4878, Dec 1997.
- [7] Guido Serini, Davide Ambrosi, Enrico Giraudo, Andrea Gamba, Luigi Preziosi, and Federico Bussolino. Modeling the early stages of vascular network assembly. *EMBO J*, 22(8):1771–1779, Apr 2003.

- [8] Fernando Martin-Belmonte, Ama Gassama, Anirban Datta, Wei Yu, Ursula Rescher, Volker Gerke, and Keith Mostov. Pten-mediated apical segregation of phosphoinositides controls epithelial morphogenesis through cdc42. *Cell*, 128(2):383–397, Jan 2007.
- [9] H. G. Hall, D. A. Farson, and M. J. Bissell. Lumen formation by epithelial cell lines in response to collagen overlay: a morphogenetic model in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 79(15):4672–4676, Aug 1982.
- [10] H. S. Bell, I. R. Whittle, M. Walker, H. A. Leaver, and S. B. Wharton. The development of necrosis and apoptosis in glioma: experimental findings using spheroid culture systems. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 27(4):291–304, Aug 2001.
- [11] Takao Ohta and Kyozi Kawasaki. Equilibrium morphology of block copolymer melts. *Macromolecules*, 19(10):2621–2632, 1986.
- [12] Hiroto Shoji, Kohtaro Yamada, Daishin Ueyama, and Takao Ohta. Turing patterns in three dimensions. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys*, 75(4 Pt 2):046212, Apr 2007.
- [13] B. Ermentrout. Stripes or spots? nonlinear effects in bifurcation of reaction-diffusion equations on the square. *Proc R Soc Lond A*, 434:413–417, 1991.
- [14] Jacob M Sawyer, Jessica R Harrell, Gidi Shemer, Jessica Sullivan-Brown, Minna Roh-Johnson, and Bob Goldstein. Apical constriction: A cell shape change that can drive morphogenesis. *Dev Biol*, Sep 2009.